



SECÇÕES FINAS DE OSSOS E DENTES FOSSILIZADOS PARA ANÁLISES AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA⁽¹⁾

LUCIANA B. CARVALHO ⁽²⁾

RESUMO: Qualquer organismo sob processo de fossilização sofre perdas de seu material original, principalmente tecidos moles. O que resta como representação desses organismos do passado são as estruturas mais resistentes de seus corpos que, no caso dos vertebrados, resumem-se praticamente a ossos e dentes. Desse material, os paleontólogos tentam retirar o máximo de informações possíveis que resgatem a história de vida desses organismos. As exigências na área fizeram com que esses profissionais utilizassem metodologias cada vez mais complexas, como o estudo histológico de lâminas de estruturas orgânicas fossilizadas nos microscópios petrográfico e biológico e, mais recentemente, o estudo de material fóssil sob o microscópio eletrônico de varredura (MEV). O presente trabalho detalha a técnica de preparação de secções finas de material fóssil de vertebrados para análises ao MEV.

Palavras-chave: vertebrados fósseis, laminação, microscópio eletrônico de varredura.

ABSTRACT: Preparation of fossilized structures of vertebrates in thin sections for analysis in the scanning electron microscope.

During the fossilization process all organisms lose part of the original material, particularly soft tissues. Only the more resistant structures of those organisms are preserved, which in vertebrates are essentially limited to bones and teeth. Based on these material, paleontologists try to retrieve the maximum information about these organisms. For this purpose professionals are making use of more and more complex methodologies, histological studies of thin sections under polarized light and, more recently, scanning electron microscope (SEM). This paper presents some of the preparation techniques of thin sections of fossilized vertebrate structures for SEM analyses.

Key words: fossil vertebrates, thin sections, scanning electron microscope.

INTRODUÇÃO

Qualquer organismo sob processo de fossilização sofre perda ou substituição de seu material original, principalmente no caso dos tecidos moles. O que resta como representação desses organismos são testemunhos das estruturas mais resistentes de seus corpos, que no caso dos vertebrados resumem-se praticamente a ossos e dentes. Desse material, os paleontólogos tentam resgatar o máximo de informações a respeito dos organismos viventes no passado. O desenvolvimento das pesquisas nessa área propiciou aos profissionais a utilização de metodologias cada vez mais complexas, como o estudo histológico, embasado na análise de lâminas delgadas de estruturas orgânicas fossilizadas e, mais recentemente, o estudo de material fóssil sob o microscópio eletrônico de varredura (MEV). No caso dos ossos e dentes aqui utilizados, esta última metodologia, além de permitir observações

impossíveis ao microscópio óptico, pode ser efetivada de duas formas: o material fossilizado pode ser levado ao MEV inteiro ou representado por um fragmento, quando se deseja observar a estrutura externa da amostra, ou então, pode-se submeter o exemplar a uma análise no MEV através de secções finas, quando observações ultra-estruturais são desejadas. O presente trabalho trata, principalmente, da técnica de preparação de secções delgadas de material fóssil para análises ao MEV. A técnica aqui apresentada é o resultado do aperfeiçoamento e adequação ao trabalho com estruturas fossilizadas de vertebrados, principalmente dentes e ossos, desenvolvido no Setor de Paleovertebrados do Museu Nacional/UFRJ a partir de metodologias anteriormente utilizadas por outros autores (ØRVIG, 1951, 1957; HIRSCH, 1979; CHINSAMY & RAATH, 1992; SANDER, 1999). Esse processo assemelha-se muito ao utilizado para a produção de lâminas de material fóssil, para análises histológicas no microscópio óptico comum, com

¹ Entregue em 31/07/2001. Aceito em 28/03/2002.

² Museu Nacional/UFRJ, Departamento de Geologia e Paleontologia, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP).
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
E-mail: lucbc@acd.ufrj.br.

exceção das etapas finais, que envolvem tratamentos específicos para que o material esteja pronto para ser submetido ao MEV. Todo o trabalho é feito manual e artesanalmente. Existem alguns equipamentos que, em certas situações, podem acelerar o processo de fabricação das lâminas. Porém, a proposta do presente trabalho é detalhar a técnica manual, de forma que o pesquisador que venha a utilizá-la possa adequá-la a seu laboratório e por si próprio encontrar novos equipamentos que melhorem ou acelerem o processo.

MATERIAL

As amostras utilizadas no desenvolvimento da técnica foram obtidas junto à coleção de paleovertebrados do Departamento de Geologia e Paleontologia, Museu Nacional/UFRJ, consistindo de ossos e dentes de répteis cretáceos, especialmente do grupo dos dinossauros e mosassaurídeos.

O material utilizado nessa técnica é de fácil aquisição e, de modo geral, pode ser encontrado em lojas especializadas em construção civil e em lojas de material biológico e odontológico. Equipamentos como microscópio óptico e lupa fazem parte do conteúdo básico de um laboratório de paleontologia. Material necessário para a produção de seções delgadas:

- Resina epóxi. Para inclusão das peças a serem analisadas.
- Base para inclusão das peças na resina, que precisam de um local onde seja possível passar pelo processo de endurecimento e depois ser retirada, para posterior colagem na lâmina. No Setor de Paleovertebrados do Museu Nacional foi criada uma base em silicone, mas similar pode ser adquirida em empresas especializadas em equipamentos para laboratório e laminação.
- Lixas d'água de granulação 180, 400, 600, 1200, 2000. Essas lixas serão utilizadas no polimento das peças já incluídas na resina.
- Lâminas histológicas, onde serão coladas as peças a serem analisadas.
- Adesivo epóxi de polimerização rápida (Araldite ou similar), utilizado para a fixação do bloco (peça já inclusa na resina) na lâmina.
- Lupa estereoscópica para avaliação da ação abrasiva das lixas sobre a amostra.
- Microscópio biológico ou petrográfico utilizado para determinar a progressiva evolução da espessura da seção.
- Ultra-som utilizado na limpeza final da lâmina.
- Estufa para retirada da umidade da lâmina que contém a amostra.

- Ácido clorídrico 2N para ressaltar o relevo de algumas estruturas a serem observadas.

MÉTODO

O primeiro passo para se confeccionar as seções é selecionar os exemplares que se deseja analisar e o tipo de corte de interesse (oblíquo, transversal, tangencial ou longitudinal). Em geral o material precisa ser fragmentado para que seja adequado ao tamanho e tipo de corte. O próximo passo é a preparação da resina epóxi onde será incluída a amostra. A resina precisa receber um catalisador (na proporção indicada pelo fabricante) de forma a acelerar seu processo de solidificação. Após, deve-se misturar bem o catalisador com a resina, despejá-la nos espaços disponíveis da base de silicone ou em um recipiente que dará forma à resina e, logo em seguida, incluir o material de estudo. Essa última etapa deve ser relativamente rápida para evitar que a resina endureça antes que a peça esteja corretamente posicionada.

O tempo de endurecimento da resina varia conforme a qualidade da mesma e de acordo com fatores diversos, como temperatura e quantidade de catalisador. É prudente esperar 24 horas antes de começar o trabalho de polimento, pois a resina precisa estar bem resistente para garantir que o material incluído não seja perdido durante o polimento.

Assim que a resina se mostrar com uma consistência sólida, pode-se iniciar a primeira etapa de polimento, que consiste em utilizar a lixa d'água de granulação mais grossa (180) no lado da resina onde se encontra o corte de interesse. O polimento com a lixa 180 deve ser feito até que o excesso de resina seja retirado e tenha-se atingido o material. A partir daí, começa a utilização da próxima lixa, que possui uma granulação média (400). O objetivo dessa seqüência de polimento é, ao passar de uma lixa de granulação grosseira para lixas com granulações mais finas, ir retirando o máximo de riscos provocados pelos grânulos das lixas anteriores. Esse procedimento evita que ocorram interferências na análise do material. A passagem de uma lixa de granulação grossa para outra de granulação mais fina depende da observação da superfície do material sob a lupa. Dessa forma, é possível acompanhar a substituição dos riscos mais profundos pelos riscos cada vez mais superficiais. Ao notar que todos os riscos provocados pela lixa anterior foram substituídos pelos riscos da lixa que está sendo utilizada no momento, pode-se passar para a próxima lixa com granulação mais fina (600).

A escolha da lixa d'água para o polimento deve-se à possibilidade de utilização deste tipo de lixa em conjunto com a água. A água evita que uma grande quantidade de poeira seja levantada durante o processo de polimento, o que poderia prejudicar os equipamentos próximos, além de evitar a absorção do pó de resina pelo preparador. Esse último cuidado é essencial, pois algumas resinas são tóxicas, portanto, prejudiciais ao organismo humano. Além disso, a água serve como anteparo de proteção para o material já que os grânulos das lixas estarão envolvidos por ela.

Com o final da utilização da lixa d'água 600, procede-se à utilização das lixas de granulação 1200 e 2000. Após essa etapa, a área a ser observada no MEV já deve estar totalmente exposta. Caso isso não tenha ocorrido, deve-se reiniciar o polimento com a lixa 600, passando para as seguintes, até atingir a superfície de interesse.

É importante notar que o polimento deve ser realizado sem pressão excessiva sobre o material, e o processo, por ser bastante delicado, necessita ser feito sem pressa e com observação constante na lupa. Alguns profissionais fazem uso de um produto conhecido como "pasta de diamante" para uma última etapa de polimento. Esse processo, embora amplamente utilizado na produção de lâminas petrográficas, é considerado desnecessário, corroborando dados bibliográficos (SANDER, 1999), quando a amostra consiste de ossos e dentes fossilizados de vertebrados e se destina à observação ao MEV.

O próximo passo é a colagem da superfície polida na lâmina. Antes, deve-se lavar com detergente e água corrente a lâmina e a superfície polida do material, para que as impurezas e a gordura passadas pela superfície da mão do polidor possam ser retiradas. Esse detalhe é de grande importância, pois caso ainda restem impurezas na área a ser observada, elas poderão atrapalhar as análises ao microscópio. Qualquer resquício de gordura na superfície da lâmina ou no material durante a colagem formará bolhas que poderão provocar a perda do material durante o processo seguinte.

A superfície polida deve ser colada com Araldite ou similar na lâmina. O adesivo tem a propriedade de secagem e endurecimento rápido, além de ser bastante resistente; porém, é interessante aguardar cerca de 24 horas para a secagem completa. A embalagem desse adesivo fornece instruções que demonstram a necessidade de não se utilizar o tempo mínimo para o endurecimento, pois dependendo das condições climáticas no dia da colagem das peças, o tempo de endurecimento pode

variar. Outro cuidado na hora da colagem é a formação de bolhas de ar entre a superfície da lâmina e a do material, detectada a partir da observação na lupa da superfície de colagem. Caso existam bolhas, basta pressionar o material contra a lâmina que elas tendem a escapar pelas laterais.

O próximo passo após a secagem e endurecimento do Araldite é o lixamento da superfície oposta à que foi colada. Essa etapa novamente se inicia com a lixa d'água 180; após, procede-se como na superfície anterior, substituindo as lixas progressivamente, da mais grosseira à mais fina (400 → 2000). Como o MEV realiza a leitura da superfície da amostra, não é necessário desgastar o material até atingir espessuras muito delgadas, como as utilizadas quando das análises histológicas ao microscópio óptico. A vantagem de se fazer a lâmina está em obter uma superfície horizontal quase perfeita, o que facilita algumas análises ao MEV.

A lâmina nesta etapa está pronta, mas para que possa ser utilizada no MEV é necessário que todas as impurezas e gorduras sejam eliminadas da mesma. Para isso, lava-se a lâmina em água corrente com detergente; em seguida, deve-se lavá-la no ultra-som para que as impurezas que não são detectadas a olho nu possam ser removidas. O banho da lâmina no ultra-som deve ser feito com cautela e de forma rápida (15 a 30 segundos), evitando que o material seja destruído durante o processo. Um outro fator influenciável nas análises no MEV é a umidade. É aconselhável o transporte da lâmina a uma estufa para que toda a umidade seja eliminada.

Em dentes de vertebrados fósseis utiliza-se o ácido clorídrico 2N para ressaltar o relevo dos cristais de hidroxiapatita que formam a estrutura interna do esmalte. A amostra deve ser imersa no ácido por cerca de 3 a 5 segundos e, posteriormente, lavada em água corrente.

Neste momento, a lâmina está pronta para ser levada ao laboratório de microscopia eletrônica de varredura. Caso isso não ocorra logo em seguida ou após a análise no MEV, aconselha-se guardar a lâmina em lugar seco (de preferência, com pastilhas de sílica gel que absorvem a umidade) e livre de impurezas, para que não seja necessária a repetição da última etapa de limpeza antes da amostra ser levada ao MEV.

No laboratório de microscopia eletrônica de varredura, com o auxílio de um metalizador, a amostra precisa receber uma fina camada de ouro. Esse material é utilizado por ser excelente condutor dos elétrons que irão "varrer" a superfície a ser analisada, propiciando imagens com a definição desejada.

CONCLUSÕES

A análise de material fóssil ao MEV é um recurso que, ultimamente, vem sendo utilizado em escala crescente. Qualquer estrutura fossilizada pode ser observada ao MEV. A maior limitação acerca dessa atividade é devido ao alto custo dos microscópios eletrônicos de varredura, o que dificulta o desenvolvimento de pesquisas com a utilização desse tipo de ferramenta. A técnica apresentada assume especial importância por ser de baixo custo, produzir resultados excelentes e ser de rápida execução. As secções delgadas elaboradas com a técnica relatada mostraram-se extremamente funcionais, permitindo a análise de estruturas impossíveis de serem observadas ao microscópio óptico. No caso dos fósseis, as análises no MEV têm demonstrado resultados de grande valor, inclusive de sistemática, em estudos feitos com ossos (CURREY, 1962; CARTER, 1990; CHINSAMY, 1994; CHINSAMY, CHIAPPE & DODSON, 1994; CHINSAMY, 1995; CHINSAMY & DODSON, 1995; CHINSAMY, CHIAPPE & DODSON, 1995), dentes (ØRVIG, 1967; SANDER, 1997; CARVALHO, FARIÑA & AZEVEDO, 1997; SANDER, 1999), ovos (HIRSCH, 1979; JENSEN, 1970; ZHAO & ZHAO, 1998) e em análises de tecido mole fossilizado (CAMPOS & KELLNER, 1997; KELLNER, 1996; KELLNER & CAMPOS, 1998).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos Fariña (Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro), pela orientação na confecção de lâminas histológicas e nas análises ao MEV; aos professores Dr. Sergio Alex Kugland de Azevedo (MNRJ) e Dr. Miguel T. U. Rodrigues (Instituto de Biociências/USP), pelas sugestões; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, D.A. & KELLNER, A.W.A., 1997 – Fossilized soft tissue preservation in the Lower Cretaceous of Basin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, **69**(1):145-146.
- CARTER, J.G. (Ed.), 1990 – **Skeletal biomineralization: Patterns, processes and evolutionary trends**. New York: Van Nostrand Reinhold. v.1, 832p.
- CARVALHO, L.B.; FARIÑA, M. & AZEVEDO, S.A.K., 1997 – Structural analysis on Cretaceous/Paleocene teeth (Mosasauridae and Mesosuchia) from Pernambuco/Paraíba basin, Northeast Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PALEONTOLOGIA, 15., São Pedro.
- Resumos...**, Rio Claro: UNESP. p.91.
- CHINSAMY, A. & RAATH, M.A., 1992 – Preparation of fossil bone for histological examination. **Palaeontology of Africa**, Johannesburg, **29**:39-44.
- CHINSAMY, A., 1994 – Dinosaur bone histology: Implications and inferences. In: ROSENBERG, G.D. & WOLBERG, D.L. (Eds.) **Dino Fest**. Indianápolis: Paleontological Society Special Publication. v.7, p.213-227.
- CHINSAMY, A., 1995 – Ontogenetic changes in the bone histology of the Late Jurassic ornithopod *Dryosaurus lettowvorbecki*. **Journal of Vertebrate Paleontology**, Chicago, **15**(1):96-104.
- CHINSAMY, A.; CHIAPPE, L.M. & DODSON, P., 1994 – Growth rings in Mesozoic birds. **Nature**, London, **368**:196-197.
- CHINSAMY, A.; CHIAPPE, L.M. & DODSON, P., 1995 – Mesozoic avian bone microstructure: Physiological implications. **Paleobiology**, Chicago, **21**(4):561-574.
- CHINSAMY, A. & DODSON, P., 1995 – Inside a dinosaur bone. **American Scientist**, New Haven, **83**:174-180.
- CURREY, J.D., 1962 – The histology of the bone of a prosauropod dinosaur. **Palaeontology**, London, **5**(2):238-246.
- HIRSCH, K.F., 1979 – The oldest vertebrate egg? **Journal of Paleontology**, Tulsa, **53**(5):1068-1084.
- JENSEN, J.A., 1970 – Fossil eggs in the Lower Cretaceous of Utah. **Brigham Young University of Geology Studies**, Utah, **17**:51-60.
- KELLNER, A.W.A., 1996 – Fossilized theropod soft tissue. **Nature**, London, **379**:32.
- KELLNER, A.W.A. & CAMPOS, D.A., 1998 – Archosaur soft tissue from the Cretaceous of the Araripe Basin, Northeastern Brazil. **Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Geologia**, Rio de Janeiro (42):1-22.
- ØRVIG, T., 1951 – Histologic studies of Placoderms and fossil Elasmobranchs. 1. The endoskeleton, with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. **Arkiv für Zoologie**, Stockholm, **2**(2):321-454.
- ØRVIG, T., 1957 – Remarks on the vertebrate fauna of the Lower Upper Devonian of Escuminac Bay, P.Q., Canada, with special reference to the Porolepiform Crossopterygians. **Arkiv für Zoologie**, Stockholm, **10**(2):367-426.
- ØRVIG, T., 1967 – Phylogeny of tooth tissues: Evolution of some calcified tissues in early vertebrates. In: MILES, A.E.W. (Ed.) **Structural and chemical organization of teeth**. New York, London: Academic Press. v.1, p.45-110.
- SANDER, P.M., 1997 – Teeth and Jaws. In: CURRIE, P.J. & PADIAN, K. (Eds.) **Encyclopedia of dinosaurs**. New York, London: Academic Press. p.717-725.
- SANDER, P.M., 1999 – The microstructure of reptilian tooth enamel: Terminology, function, and phylogeny. **Münchner Geowissenschaften Abhandlungen**, München, **38**(A):1-102.
- SASSO, C.D. & SIGNORE, M., 1998 – Exceptional soft-tissue preservation in a theropod dinosaur from Italy. **Nature**, London, **392**:383-387.
- ZHAO, H. & ZHAO, Z.K., 1998 – Dinosaur eggs from Xichuan Basin, Henan Province. **Vertebrata Palasiatica**, Beijing, **36**(4):282-296 (em Chinês com resumo em Inglês).